

# 金棚 1号番茄种子纯度检测的 SCAR 标记

王 飞<sup>1</sup> 姚明华<sup>1</sup> 巩振辉<sup>2</sup> 李晓东<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>湖北省农业科学院经济作物研究所, 武汉 430064; <sup>2</sup>西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; <sup>3</sup>西安金鹏种苗有限公司, 西安 710600)

**摘 要:** 以金棚 1号番茄及其父、母本为试材, 提取叶片 DNA, 优化构建了稳定的 RAPD 反应体系。从在番茄上多态性丰富的 100 条随机引物中筛选获得 1 条可用于鉴别母本和 F<sub>1</sub> 的引物 S130, 2 条可用于鉴别父本和 F<sub>1</sub> 的引物 S296 和 S114。将扩增所得到的差异条带进行克隆、测序, 设计出 1 对 SCAR 引物 RF2/FF2, 能特异鉴别 F<sub>1</sub> 和母本。进一步建立了以干种子为试材检测金棚 1号番茄种子纯度的 SCAR 标记检测体系。

**关键词:** 番茄; 金棚 1号; SCAR 标记; 纯度鉴定

**中图分类号:** S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6346 (2009) 02-0026-04

## Identification of Genetic Purity of Seed of 'Jinpeng No. 1' Tomato by SCAR

WANG Fei<sup>1</sup>, YAO Ming-hua<sup>1</sup>, GONG Zhen-hui<sup>2</sup>, LI Xiao-dong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Cash Crop Research Institute, Hubei Province Agriculture Academy of Sciences, Wuhan 430064, Hubei, China; <sup>2</sup>College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; <sup>3</sup>Xian Jinpeng Seed Co., Ltd., Xian 710600, Shaanxi, China)

**Abstract:** Selected from 100 arbitrary oligonucleotide primers, one primer could separate female parent from F<sub>1</sub> hybrid, and two primers could separate male parent from F<sub>1</sub> hybrid. The band S130<sub>771</sub> was sequenced and converted to SCAR marker to separate female parent from F<sub>1</sub> hybrid. It was used to test the purity of 'Jinpeng No. 1' tomato hybrid with dry seed.

**Key words:** Tomato; 'Jinpeng No. 1'; SCAR marker; Purity identification

金棚 1号番茄是目前国内日光温室、大棚等保护地栽培面积较大的一代杂种。其外部形态学特征与母本有很高的相似性, 常规的成株纯度检测 F<sub>1</sub> 种子的方法受检测人员的田间经验影响较大。应用分子标记技术鉴定 F<sub>1</sub> 是否混有母本种子, 比常规成株鉴定的准确度更高。在目前的几种分子标记系统中, RAPD 标记技术是在杂种纯度鉴别上应用最广的一种分子标记技术, 但其重复性比较差。因此, 本试验拟在研究番茄 DNA 提取方法的基础上, 以金棚 1号番茄及其父、母本为材料, 建立金棚 1号番茄种子纯度的 SCAR 标记检测体系, 并进一步以金棚 1号番茄干种子为试材进行验证。这一体系的建立, 为金棚 1号番茄种子的生产与销售提供了有效的检测方法, 对推动番茄产业化发展具有重要意义。

收稿日期: 2008-04-10; 接受日期: 2008-08-15

基金项目: 西安金鹏种苗有限公司科研基金资助 (2004HX-3)

作者简介: 王飞, 硕士, 助理研究员, 专业方向: 茄果类育种, E-mail: wangfei\_raymond@yahoo.com.cn

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试材料

供试材料金棚 1号番茄及其亲本由西安金鹏种苗有限公司提供。2005年 8月, 于西北农林科技大学园艺学院重点实验室对种子进行温汤浸种处理后, 置于设定好培养参数的人工气候箱中催芽, 出苗, 长至 5~8片真叶后, 移栽入西北农林科技大学园艺场的大棚中进行常规管理。

### 1.2 方法

1.2.1 模板 DNA的提取 叶片 DNA和种子 DNA提取均采用王飞等<sup>[1]</sup>的方法。

1.2.2 RAPD反应体系的优化 采用 25  $\mu\text{L}$ 的反应体系, 模板 DNA用量 20~80 ng, 2  $\times$ dNTP 0.05~0.20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Taq酶 1 U。热循环参数为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3~5 min。退火温度为 34~37  $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.3 RAPD反应条件 在 25  $\mu\text{L}$ 的反应体系中含 Tris-HCl 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , KCl 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  2.0  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 2  $\times$ dNTP 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 引物 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 20 ng, Taq酶 1 U, 在反应液上覆盖 20  $\mu\text{L}$ 的矿物油; 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 36  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min的程序扩增 35个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取 12  $\mu\text{L}$ 扩增产物与 2  $\mu\text{L}$  6  $\times$ loading buffer混匀, 点入含 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭 (EB) 的 1.0%琼脂糖凝胶点样孔中, 用 1  $\times$ TAE缓冲液在 4  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电场强度下电泳 40 min, 取出凝胶用凝胶成像仪观察电泳结果, 并照相。

1.2.4 RAPD引物多态性筛选 以金棚 1号番茄及其父、母本筛选 RAPD多态性引物, 凡是在父、母本中能扩增出特异条带的引物都可用于品种纯度鉴定, 共筛选 100条随机引物。

1.2.5 RAPD标记的回收、克隆及测序 共回收克隆 1个片段 S130<sub>771</sub>, 具体步骤参见文献 [2]。

1.2.6 SCAR引物的设计 根据 RAPD片段的测序结果, 用 Primer5.0程序设计包含 RAPD引物的 SCAR引物序列。

1.2.7 SCAR标记鉴别金棚 1号番茄的品种纯度 对金棚 1号番茄母本和 100粒  $F_1$ 干种子逐粒提取 DNA, 而后用 SCAR引物进行检测。在 25  $\mu\text{L}$ 的反应体系中含 Tris-HCl 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , KCl 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 2  $\times$ dNTP 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 引物 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 10 ng, Taq酶 1 U, 在反应液上覆盖 20  $\mu\text{L}$ 的矿物油; 热循环参数为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 50~60  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min的程序扩增 30个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。取 12  $\mu\text{L}$ 扩增产物与 2  $\mu\text{L}$  6  $\times$ loading buffer混匀, 点入含 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  EB的 1.0%琼脂糖凝胶点样孔中, 用 1  $\times$ TAE缓冲液在 4  $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电场强度下电泳 40 min, 取出凝胶用凝胶成像仪观察电泳结果, 并照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD反应体系的稳定性

本试验中, 利用几条引物验证 RAPD体系的稳定性, 其中 S174、S130、S296和 S114引物反复扩增验证达 20次左右, 扩增图谱始终不变, 说明反应体系有一定的可靠性和稳定性。平均每条引物扩增条带 6.5条, 这也反映本体系的扩增效率较高 (图 1~4)。

### 2.2 RAPD引物的多态性筛选

从 100条在番茄上多态性丰富的引物中, 筛选出 3条特异 RAPD引物, 通过扩增测序重复验证。S130<sub>771</sub>为父本和  $F_1$ 特有的 RAPD标记。由于父本和  $F_1$ 形态学差异很大, 所以此标记可特异鉴别母本和  $F_1$  (图 2)。S296<sub>543</sub>、S114<sub>943</sub>为母本和  $F_1$ 特有的 RAPD标记, 此标记可特异鉴别父本和  $F_1$  (图 3、4)。

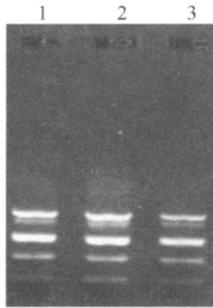


图1 RAPD引物 S174 扩增结果

1—F<sub>1</sub> 扩增结果；2—父本扩增结果；3—母本扩增结果。

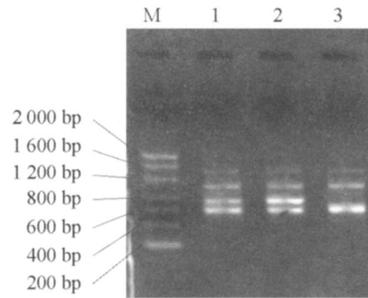


图2 RAPD引物 S130 扩增结果

1—F<sub>1</sub> 扩增结果；2—父本扩增结果；3—母本扩增结果；M—Marker V。

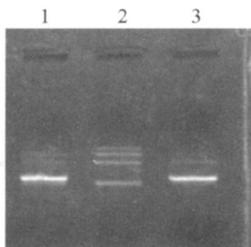


图3 RAPD引物 S296 扩增结果

1—F<sub>1</sub> 扩增结果；2—父本扩增结果；3—母本扩增结果。

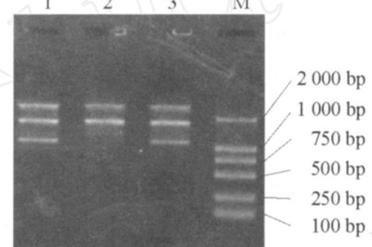


图4 RAPD引物 S114 扩增结果

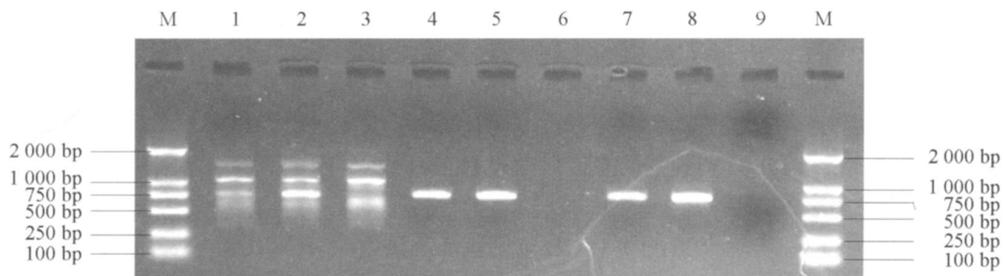
1—F<sub>1</sub> 扩增结果；2—父本扩增结果；3—母本扩增结果；M—Marker DL2000。

### 2.3 SCAR引物的设计、检测及验证

根据 S130<sub>771</sub>片段的测序结果，用 Primer5.0程序设计包含 RAPD引物的 SCAR引物序列。引物设计好后，由北京鼎国生物技术公司合成。预期产物大小为 771 bp (表 1)。在退火温度为 56 的条件下，利用 SCAR引物 RF2/FF2对金棚 1号番茄及父、母本的叶片和干种子 DNA 进行扩增，扩增结果如图 5所示。对金棚 1号番茄母本和 100粒 F<sub>1</sub>干种子 DNA 进行扩增，其中有 15粒种子

表 1 SCAR标记的引物

引物	引物序列	产物所在区域
RF2	TGGAA GCTTG GACAA GTTAT	16 ~ 787 bp
FF2	GGAAG CTGG TCATC TTGAG	16 ~ 787 bp

图5 RAPD及 SCAR引物对亲本及 F<sub>1</sub> DNA 扩增结果

1—引物 S130对 F<sub>1</sub> 扩增结果；2—引物 S130对父本扩增结果；3—引物 S130对母本扩增结果；4、7—引物 RF2/FF2对 F<sub>1</sub> 扩增结果；5、8—引物 RF2/FF2对父本扩增结果；6、9—引物 RF2/FF2对母本扩增结果；M—Marker DL2000。

未扩增出条带。未扩增出条带的原因很多,但主要有三种情况:一是种子为母本自交产生的;二是种子为  $F_1$  干种子,但所提取 DNA 有蛋白污染,质量不高,造成 PCR 无法正常扩增;三是种子生活力较低,即使正常播种也无法长出植株。部分扩增结果见图 6。

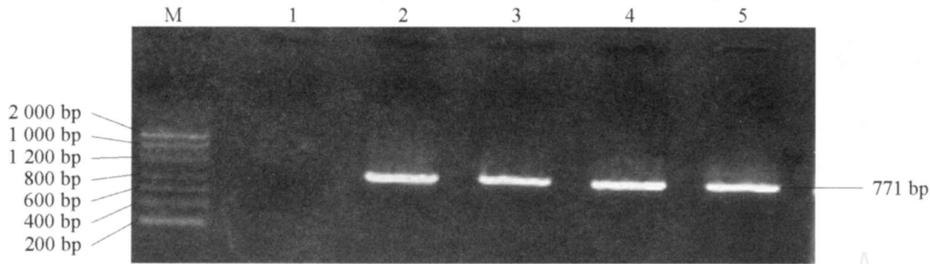


图 6 SCAR引物 RF2/FF2对母本和  $F_1$  DNA 的扩增结果

1—母本扩增结果; 2~5— $F_1$ 扩增结果; M—Marker。

### 3 结论与讨论

以 SCAR 标记 S130<sub>771</sub>对金棚 1号番茄进行品种纯度测定,在 100粒干种子中共检出 85粒有特异条带。说明该方法有一定的可行性,为大规模应用研究奠定了基础。将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记,可使 PCR 分析简化,且使 RAPD 标记的特异性更稳定<sup>[3-4]</sup>。本试验获得的 SCAR 标记 S130<sub>771</sub>能稳定准确地鉴别母本和  $F_1$ ,能够弥补田间检测的不足并最终取代田间检测,使解决金棚 1号番茄商业制种过程中母本假杂种的问题有了新进展。

#### 参考文献

- [1] 王飞, 巩振辉, 马维, 王莎莎, 蔡义勇, 李晓东. 一种适用于 PCR 检测的番茄 DNA 微量提取方法 [J]. 西北农业学报, 2006, 15 (1): 169 - 172.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 2版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 干滢, 曾凡亚, 赵云, 王茂林. 杂交油菜“蜀杂 6号”特异序列扩增标记 (SCAR) 建立及其在杂种鉴定中的应用 [J]. 作物学报, 2001, 27 (6): 722 - 728.
- [4] 许勇, 张海英, 康国斌, 王永健, 陈杭. 西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择的研究 [J]. 遗传学报, 2000, 27 (2): 151 - 157.